

## 明細書

## 抗N C 1 モノクローナル抗体

## 技術分野

本発明は、抗N C 1 モノクローナル抗体を用いる腎炎検出方法及び検出試薬に関する。更に、治療の用具、医薬品を含む。

## 背景技術

従来、腎炎検出の主な指標は、尿を試料として、蛋白、アルブミン、タイプIVコラーゲン（三本鎖領域）、 $\beta$ 2Mなどである。又、従来の腎炎の確定診断法は、腎生検で得た腎切片を染色し、免疫グロブリンの沈着や半月体の形成などを観察することであった。例えば、IgA腎症の診断基準は、確定診断として腎生検が唯一の方法で、具体的には、「びまん性にメサンギウム領域を主体とするIgAの顆粒沈着」を蛍光抗体又は酵素抗体染色で所見するとしている（1071頁「臨床検査2001～2002」文光堂刊）。

## 発明の開示

## 発明が解決しようとする課題

これらは次のような問題点があった。

前者は、それぞれ優れた指標であるが、各種腎炎の進行した状態で見られる糸球体への免疫グロブリンの沈着に対し抗原が何であるか回答するものでは無いので腎炎の本質に迫るものでは無い。

後者の確定診断は、経験豊富な病理専門医の高度な診断技術を求められた。

又、免疫グロブリンの沈着段階では腎炎は時には数十年を経過しており、ジン機能も著しく低下している。それ故、免疫グロブリンの沈着や半月体の形成などの特異的な病理像が見られない早い段階で、極めて簡単に正確に確定診断できることが望まれていた。

## 課題を解決するための手段

本願発明は、以上のような欠点を無くし、腎炎を早期の段階で検出できる方法と試薬、更には血清浄化方法を提供するものである。

これまでに、本願発明者は、各種腎炎の共通な抗原はタイプIVコラーゲンのN C 1領域であるとしている。実際、本願発明者は、抗糸球体基底膜（G B M）抗体腎炎に限らず各種の腎炎で、免疫反応により血清や尿中に抗N C 1抗体を高頻度に見出している。一方、抗G B M抗体腎炎の抗原はN C 1領域にあり、通常は内部にあり、疾患の時に表出し、そこに自己抗体が結合すると言われている。しかし、人為的に製した抗体で、自己抗体の様に疾病時にのみ結合する抗体は存在しない。又、各種腎炎での共通な抗原の存在は免疫組織染色で観察されていない。そこで、本願発明者は、ウシ糸球体より分離精製した抗原N C 1をマウスに感作して抗N C 1モノクローナル抗体を作製し、ウエスタンプロット法や免疫染色に適合し得る「抗N C 1モノクローナル抗体」及び「標識抗N C 1モノクローナル抗体」を、又、「抗N C 1モノクローナル抗体」を組み入れた「サンドイッチ法によるN C 1測定ELISAキット」を完成させた。

その手順は次の通りである。

1 [抗原の分離精製] ウシ糸球体を原料として、タイプIVコラーゲンN C 1領域（以下N C 1）を分離し、カラムクロマトグラフィーで分離精製する（J. Biol. Chem., 263, 10481-8）。

2 [抗N C 1モノクローナル抗体の作製と選択] モノクローナル抗体は定法によりマウスを用いて作製する（単クローン抗体実験マニュアル、講談社刊、1987）。融合細胞のスクリーニングではELISA法で抗体価の高い陽性穴を多数選び、次にウエスタンプロット法でN C 1モノマー及び／又はN C 1ダイマーに反応する抗体を選ぶ。続いて免疫染色を行い、サル抗糸球体基底膜（G B M）抗体腎炎の糸球体と反応するものを選ぶ。更に、サル正常腎と反応しないものを選ぶ。このようにしてELISA法でも、ウエスタンプロット法でも、免疫染色でも可能な抗N C 1モノクローナル抗体が得られる。

もちろん、抗N C 1モノクローナル抗体としては、ELISA、ウエスタンプロット、免疫染色、その他の用途の一つだけしか機能を有しないものでも、複数機

能するものでも良いが、全てに機能するものが望ましい。又免疫染色では、ウサギ他から作製したポリクローナル抗体の如く正常の腎臓にも反応するものでも良いが、腎炎との識別はできない。組織の存在確認には使える。ここで作製したカニクイサルの腎炎モデルは、従来報告されている足裏投与と異なり、背部に初回 N C 1 を 1 m g 、追加免疫 3 m g で作製している。背部への投与は足裏に打つのに比べ、サルの歩行に困難を与える、二足歩行に伴う感染の可能性も低い。又、同じ量を背部に投与する場合、1回のみ 4 m g 投与するよりも、初回量と追加免疫量を同じか追加を少量にするよりも、初回に対し追加免疫量を多くすることが良く、1.5 倍以上が好ましい。特には 3 倍が好ましい。

この原理は 2 型コラーゲン関節炎他の感作動物モデル作製やワクチンの投与でも有用である。例えば B 型肝炎ワクチンの従来投与で追加免疫しても抗体価が上昇しない例がある。この場合などは従来の 1 回投与量の 1.5 倍以上追加免疫するか、初回を従来の 2 分の 1 にし、追加免疫量をその 3 倍にする。

本願発明の「抗 N C 1 モノクローナル抗体」は間接免疫染色法でサル抗 G B M 抗体腎炎やヒト I g A 腎症の病理切片で腎糸球体基底膜を染色する。もちろんラットやマウスその他の動物種、I g A 腎症以外の腎炎各種でも同様に染色する。又、本願発明の「N C 1 測定 E L I S A キット」は原発性及び、糖尿病性腎炎等の二次性腎炎の早期検出に役立つ。特に「抗 G B M 抗体腎炎」に対して抗 N C 1 モノクロ抗体は、G B M に豊富に存在する N C 1 の損傷時に特異的に反応するので格別に高感度と成り、血清中はもとより尿中の N C 1 も鋭敏に測定できる。

更に、「抗 N C 1 モノクローナル抗体」を陽性標準として、I g A 腎症モデルの H I G A マウスの血清及び尿の抗 N C 1 抗体を E L I S A 法で測定できる。他の腎炎、糖尿病、高血圧モデルなどでも糸球体腎炎を起こすものは、抗 N C 1 抗体の測定が疾患進行の指標となる。又、感染症など他疾患モデルでも腎炎を起こす時には指標となる。

本発明者は、腎炎の初期検出の為に、「N C 1 測定 E L I S A キット」についても下記の具体的手段を確立した。本発明は、記載の測定方法及び試薬に限定され

るものではない。

即ち、抗G B M抗体腎炎において生ずるN C 1を患者等の尿中から検出する方法と測定試薬について血清の場合も並べて例示し、説明する。

### 1 N C 1を血清及び又は尿中から検出する方法と測定試薬。

試薬として、1) 抗N C 1抗体（ウサギ由来）をコートしたプレート、2) 酵素（H R P）標識抗N C 1モノクローナル抗体、3) 発色基質（T M B）、4) 反応停止液（硫酸）を用いて測定する。

ここで、「2)」を無標識にし、「2) - 2」として「酵素（H R P）標識抗マウスIgG抗体」を加えても良い。又、「1)」と「2)」との抗体部分を入れ替えるても、両方をモノクローナル抗体にしても良い。

この時、陽性標準は、ヒト患者より入手しても良いが、発明者が見出だした様に実験モデルのサルから得たものがより良い。管理されて育成され、作製するサルの方が安定した標準となり得る。更に具体的には、ヒト患者試料を一次標準とし、実際にキットに付ける二次標準はサル由来とすれば良い。

免疫反応として、酵素免疫反応が代表的にあげられるが、それに限定されず、A B法、R I A法、免疫発光法、沈降反応、凝集反応他を含む。酵素免疫反応において酵素標識の抗体としては、ポリクローナル又はモノクローナル抗体を問わない。又それを放射性物質（R I A法）、発光物質で標識した物（免疫発光法）、無標識物（沈降法、凝集法）でも良い。

反応形式は、サンドイッチ法に囚われず、競合法他でも良いが、特にサンドイッチ法が望ましい。測定試薬の構成として、抗N C 1抗体をコートするプレートを、ガラスや磁性物質にても良く、無しにして固相法を用いないことでも良い。

プレートに抗N C 1抗体（以下抗体）をコートする時、間接コートにしコート物質をアビジン、ビオチン、又はこれらの結合した成分でも良い。

又、抗原は、生体抽出物やリコンビナントのみでなく、構成ペプタイド（特定分画、合成品を含む）でも良く、抗体はこれらの抗原から作製しても良い。

測定試薬に用いる抗原の動物種としては、ヒトが望ましく、サル、ウシ、ブタ、

ニワトリ、羊、ヤギ、ウサギ、ラット他の動物でも良くこれに限定されない。更に、抗原は、複数動物種を混合したものでも良い。

抗原の由来臓器は、腎臓が望ましいが、これに限定されない。

## 2 抗N C 1 抗体を取り除く器具及び又はN C 1を取り除く器具。

抗N C 1 抗体で作製したアフィニティーカラムを用いて、血液を通すと血清中のN C 1のみが除かれる。続いて、その血液をN C 1で作製したアフィニティーカラムに通して、血清中の抗N C 1 抗体を除き、抗体も抗原もとり除かれた血液を再度体内に戻す。この原理を用いて、カニクイサルの腎炎モデル（「K 35 N C 1」（コラーゲン技術研修会製）で感作）で試すと、処置後の尿には、抗原も抗体も、処置前の半分以下となった。従来の方法での透析は患者血清で、透析前後にこのような差は見られない。もちろん、血液中のN C 1 や抗N C 1 抗体を除去できる器具であれば、前述器具に限定されない。又、N C 1 や抗N C 1 抗体を、 $\alpha$  3鎖や $\alpha$  4鎖及び又はその抗体に置き換えて、抗G B M抗体腎炎を誘導する $\alpha$  3鎖や $\alpha$  4鎖の抗原部位及び又はその抗体に置き換えても良い。

又、器具に用いる抗体は、ポリクローナルでもモノクローナルでも良いが、モノクローナルは半永久的に同一性能のものが得られるのでより望ましい。

本願発明の器具は、抗G B M抗体腎炎など緊急性を要する腎炎では特に有効である。

### 発明の効果

本発明は、腎炎の早期検出、確定診断及び腎炎や癌患者の改善に有用である。

### 実施例 1

【抗原の分離精製】ウシ腎糸球体を原料として、タイプIVコラーゲンN C 1領域（以下N C 1）を分離し、カラムクロマトグラフィーで精製する（J. Biol. Chem., 263, 10481-8）。

【抗体の作製と選択】マウスを用いて作製する（単クローナル抗体実験マニュアル、講談社刊、1987）。融合細胞のスクリーニングでは培養上清を用いてELISA

S A 法で抗体価の高い陽性穴を多数選ぶ。次にマウス腹腔内にて細胞増殖させた後、腹水を集め、ウエスタンプロットで N C 1 モノマーと N C 1 ダイマーに反応するものを選ぶ(図1)。続いてカニクイサルの正常腎臓とサル腎炎モデル(抗 G B M 抗体腎炎)の腎臓を用いて免疫染色を行い、サル抗 G B M 抗体腎炎の糸球体と反応するもので、サル正常腎と反応しないものを選ぶ(表1、図2)。

(ここで作製したカニクイサルの腎炎モデルは既に報告されている投与部位と異なり、背部皮内に初回 N C 1 を 1 m g 、追加免疫 3 m g で作製している。足裏に打つのに比べ、サルの歩行に困難を与える、感染の可能性も低い。

[カニクイサル(雌 3歳令)での N C 1 投与実験] 各群 2 匹

1)投与部位と方法; 背部皮内に N C 1 と共に同量の F C A を 1 回又は 2 回投与。

2)尿(50倍希釈)中の抗 N C 1 抗体価の測定(投与前と初回投与より 4 週後)

- 1 回投与(4 m g) 2 匹の平均(以下同) 0. 018 ⇄ 0. 087
- 2 回投与(初回 3 m g, 3 週後追加 1 m g) 0. 029 ⇄ 0. 256
- 2 回投与(初回 1 m g, 3 週後追加 3 m g) 0. 006 ⇄ 1. 037

3)測定方法; ウシ由来 N C 1 (5ug/ml) を塗布した 96 穴マイクロプレートに検体尿を加え、室温で 2 時間反応させ洗浄後、H R P 標識抗ヒト Ig G 抗体を加え、室温で 1 時間反応させて洗浄し、発色基質液を加えて 10 分後に反応停止液を加え、ただちに 450 nm の吸光度(A450nm)を測定した。)

更に、抗ヒトタイプIVコラーゲン(抗原は胎盤由来、ペプシン処理)ポリクローナル抗体(ウサギ由来)及び抗 N C 1 ポリクローナル抗体(ウサギ由来)を作製し、サル正常腎臓と腎炎モデルの腎臓とを間接免疫染色法で比較した。その結果、正常腎臓も腎炎モデルの腎臓も染まる(図3-1、図3-2)。一方、本願発明の抗 N C 1 モノクローナル抗体は、腎炎の方に良く染まる。

よって、本願発明の抗 N C 1 モノクローナル抗体は腎炎の識別に有用な染色試薬である。

事実、このようにして選ばれた抗 N C 1 モノクローナル抗体は人の糸球体腎炎、例えば Ig A 腎症の腎凍結切片で糸球体基底膜や尿細管を染色する。

ヒトでは Ig A 腎症に限らず各種の腎炎、例えば一次性的微小変化型ネフローゼ、二次性的糖尿病性腎症等の腎臓基底膜、例えば糸球体、尿細管、ボウマン嚢など

を染色し、回復した微小変化型ネフローゼや健常な腎臓を染めない（図4）。更に、この抗体の特性確認の為、タイプIVコラーゲン（ヒト胎盤由来、ペプシン処理）とNC1（ウシ腎糸球体由来、コラゲナーゼ処理）とを抗原としてウエスタンプロットでの免疫反応を見ると、NC1とは反応するがタイプIVコラーゲンとは反応しない（図5）。本願発明の抗NC1モノクローナル抗体はELISA法でも、ウエスタンプロット法でも、免疫染色でも使用可能な抗NC1モノクローナル抗体である。

### 実施例2

#### 【抗NC1抗体を取り除く器具及び又はNC1を取り除く器具】

抗NC1抗体で作製したアフィニティーカラムを用いて、血液を通すと血清中のNC1のみが除かれる。続いて、その血液をNC1で作製したアフィニティーカラムに通して、血清中の抗NC1抗体を除き、抗体も抗原もとり除かれた血液を再度体内に戻す。腎炎モデルのカニクイサル（雌、推定3歳）から血清相当4mlの血液を採取し、これを先述の2種のアフィニティーカラムを通して、再度血管に戻す。この作業を3回繰り返す。その結果、作業前後の尿中の抗体価を測定したところ、半分以下に抗体価が下がった。

### 実施例3

#### 【腎臓由来のタイプIVコラーゲンを抗原として作製した抗タイプIVコラーゲン抗体によるタイプIVコラーゲン測定キット】

タイプIVコラーゲンは、 $\alpha 1$ 鎖より $\alpha 6$ 鎖まで存在が知られている。由来臓器により $\alpha$ 鎖の構成は異なる。胎盤由来のタイプIVコラーゲンは、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ が主体で、腎臓由来のタイプIVコラーゲンは胎盤由来に比べ $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ に富んでいる。腎臓由来のタイプIVコラーゲンを得るには、ウシ腎より糸球体基底膜を取り出し定法のペプシン分解を行い抽出する。この時混入の恐れがあるNC1微細末を、別途用意した抗NC1抗体のアフィニティーカラムで除去する。この操作を行う事で、純粋の腎臓由来のタイプIVコラーゲンが得られる。又、これを抗原とする事で特異性の高い抗体が得られる。

## 抗体値の測定；

96穴プレートに抗原（1)ウシ腎糸球体由来ペプシン可溶化タイプIVコラーゲン、2)ヒト胎盤由来ペプシン可溶化タイプIVコラーゲン）をコートし、検体100u<sub>l</sub>を加え、室温で2時間反応後、H R P 標識抗体（検体がマウス由来の時は抗マウス、ウサギの時は抗ウサギ、ヤギの時は抗ヤギの各抗体）を加え、室温で1時間反応後、T M B 液を加え、室温で10分反応後、1N硫酸で反応を停止し、直ちに450nmで測定する。

## 検体と測定結果；

- ・検体／抗ヒト胎盤由来タイプIVコラーゲンモノクロ抗体（免疫動物／マウス、3種類；1A, 1B, 1E）；
  - 1)いずれもマイナス（バックグラウンドを引いている、以下同じ）
  - 2)1A/1.826, 1B/2.188, 1E/2.222
- ・検体／抗ヒト胎盤由来タイプIVコラーゲンポリクロ抗体（免疫動物／ウサギ、YOKO203）； 1)2.391 2)2.231
- ・検体／市販抗ヒト胎盤由来タイプIVコラーゲンモノクロ抗体（免疫動物／マウス、F59）； 1)0.047 2)2.135
- ・検体／市販抗ヒト胎盤由来タイプIVコラーゲンポリクロ抗体（免疫動物／ヤギ、GOAT） 1)0.450 2)2.037
- ・抗体YOKOのみが、ウシ腎糸球体由来ペプシン可溶化タイプIVコラーゲンとヒト胎盤由来ペプシン可溶化タイプIVコラーゲンの両者に反応したが、それ以外は、いずれか一方のタイプIVコラーゲンにしか反応しなかった。

結論；腎臓由来のタイプIVコラーゲンを測定するには、腎臓由来のタイプIVコラーゲンを抗原とする抗体で作製した試薬（E L I S A キットなど）で測定する事が良い。

又、腎機能の評価に抗タイプIVコラーゲン抗体を測定する時は、抗原には腎臓由来のタイプIVコラーゲンを用いて測定する事が良い。

## 実施例 4

[I g A腎症モデルのH I G Aマウスでの抗N C 1抗体の測定]

H I G A マウス 4 週令の雄 3 匹を購入し、飼育測定を行った。採血は 1 回分を、採尿は 1 日数回分を合わせて同一検体とした。又、血清は 200 倍に希釈し、尿は 4 倍に希釈して測定した。測定方法は E L I S A 法による。

- ・ 6 週令以降の血清では全例で、 I g A 抗体も I g G 抗体も測定される。
- ・ 尿中では 15 週令で I g A 抗体が、 18 週令で I g G 抗体が検出された。

#### 図面の簡単な説明

##### 図 1 ウエスタンプロッティングに依る抗体の選出

レーン 1 7 はコントロール、 p o l y は抗 N C 1 ポリクローナル抗体を示す

##### 図 2 抗 N C 1 モノクローナル抗体に依るカニクイサル正常腎と腎炎モデルとの染色比較（間接免疫組織染色）

##### 図 3-1 抗ヒトタイプIVコラーゲン（胎盤由来、ペプシン処理）ポリクローナル抗体（ウサギ由来）に依るカニクイサル正常腎と腎炎モデルとの染色比較（間接免疫組織染色）

##### 図 3-2 抗 N C 1 ポリクローナル抗体（ウサギ由来）に依るカニクイサル正常腎と腎炎モデルとの染色比較（間接免疫組織染色）

##### 図 4 抗 N C 1 モノクローナル抗体に依るヒト各種腎炎の染色（間接免疫組織染色）

##### 図 5 タイプIVコラーゲン（ヒト胎盤由来、ペプシン処理）と N C 1 （ウシ腎糸球体由来、コラゲナーゼ処理）とを抗原としたウエスタンプロッティング

anti NC1 mono 12D は抗 N C 1 モノクローナル抗体

anti NC1 poly は抗 N C 1 ポリクローナル抗体

anti type IV は抗ヒトタイプIVコラーゲンポリクローナル抗体

control は一次抗体無添加

#### 表 1 染色の手順

表 1

材料；カニクイサルの抗G B M抗体腎炎モデル及び健常の凍結腎臓組織  
(O C Tコンパウンドに包埋、ドライアイス・アセトンあるいは  
液体窒素を用いて急速凍結、-80°C保存)

抗体；一次抗体 抗N C 1モノクローナル抗体 (マウス由来)  
二次抗体 F I T C標識抗マウス抗体 (ウサギ由来)  
(DAKO社、Code No. F0232, Lot. 045)

染色手順；

- 1) クリオスタッフで凍結切片作製
- 2) 風乾後、アセトンで5分間固定
- 3) リン酸緩衝液 (P B S, pH 7.4) で洗浄
- 4) 一次抗体 (500倍希釈液) で室温2時間反応
- 5) P B S で洗浄
- 6) 二次抗体 (50倍希釈液) で室温1時間反応
- 7) P B S で洗浄
- 8) グリセリンで封入

## 請求の範囲

- 1 ヒト及び／又は動物の腎糸球体中のタイプIVコラーゲンN C 1領域又はそのペプタイド（以下N C 1）と免疫反応をする抗N C 1モノクローナル抗体
- 2 ヒト及び／又は動物の腎炎の糸球体中のN C 1と免疫反応をする抗N C 1モノクローナル抗体
- 3 ヒト及び／又は動物の腎炎の糸球体中のN C 1と免疫反応をする標識物質で標識した抗N C 1モノクローナル抗体
- 4 請求項1の抗N C 1モノクローナル抗体を用いた生体試料中のN C 1検出方法
- 5 抗N C 1抗体を取り除く器具
- 6 N C 1を取り除く器具
- 7 腎臓由来のタイプIVコラーゲンを抗原として作製した抗タイプIVコラーゲン抗体によるタイプIVコラーゲン測定キット
- 8 抗体作製時やワクチン投与で追加免疫する時、追加免疫の投与量を初回量より多くする投与方法
- 9 疾患モデル動物で腎炎の指標として生体試料中の抗N C 1抗体を用いる方法と試薬
- 10 動物の腎炎モデルやヒト腎炎の腎臓を染色し、健常腎臓を染色しない事を目的として抗N C 1モノクローナル抗体を用いる免疫組織染色方法

補正書の請求の範囲 [2005年8月5日(05.08.05)国際事務局受理:出願当初の請求の範囲1—9は補正された;出願当初の請求の範囲10は取り下げられた。  
(1頁)]

#### 請求の範囲

1. (補正後) 動物の腎炎モデルやヒト腎炎の腎臓を染色し、健常腎臓を染色しないことを目的に抗 NC1 モノクローナル抗体を用いることによる免疫組織染色方法。
2. (補正後) 免疫組織染色に用いる時、動物の腎炎モデルやヒト腎炎の腎臓を染色し、健常腎臓を染色しないことを特徴とする抗 NC1 モノクローナル抗体
3. (補正後) ヒト及び/又は動物の腎糸球体より抽出したタイプIVコラーゲン NC1 領域又はそのペプタイド(以下 NC1 という)と、ELISA 法とウェスタンプロット法との両方法を用いて免疫反応をすることを特徴とする抗 NC1 モノクローナル抗体
4. (補正後) ヒト及び/又は動物の腎糸球体より抽出した NC1 と ELISA 法とウェスタンプロット法との両方法を用いて免疫反応をし、かつ、免疫反応として免疫組織染色に用いる時、正常腎臓を染色せず腎炎の腎臓を染色することを特徴とする抗 NC1 モノクローナル抗体
5. (補正後) 腎炎を検出する為に、請求項 3 の抗 NC1 モノクローナル抗体を用いた生体試料中の NC1 の免疫的検出方法
6. (補正後) 抗 NC1 抗体を取り除く器具
7. (補正後) NC1 を取り除く器具
8. (補正後) 請求項 3 の抗 NC1 モノクローナル抗体を精製時に用いた腎臓由来のタイプ IVコラーゲンを抗原として作製した抗タイプIVコラーゲン抗体によるタイプIVコラーゲン測定キット
9. (補正後) 抗体作成時やワクチン投与で追加免疫する時、追加免疫の投与量を初回量より多くする投与方法
10. (削除)

## 条約 19 条に基づく説明書

請求の範囲第 1 項は、出願時の請求の範囲第 10 項と同一である。

請求の範囲第 2 項は、新たに追加された請求の範囲であり請求の範囲第 1 項に用いられる抗 NC1 モノクローナル抗体を特定したものである。

請求の範囲第 3 項は、出願時の請求の範囲第 1 項の免疫反応を限定したものである。

請求の範囲第 4 項は、新たに追加された請求の範囲であり、請求の範囲第 3 項の免疫反応を限定したものである。

請求の範囲第 5 項は、出願時の請求の範囲第 4 項を修正かつ限定したものである。

請求の範囲第 6 項は、出願時の請求の範囲第 5 項と同一である。

請求の範囲第 7 項は、出願時の請求の範囲第 6 項と同一である。

請求の範囲第 8 項は、出願時の請求の範囲第 7 項を修正かつ限定したものである。

請求の範囲第 9 項は、出願時の請求の範囲第 8 項と同一である。

何れの請求の範囲も明細書に十分サポートのある発明である。

国際調査で引用された文献（文献 1 と文献 2）では、抗 NC1 モノクローナル抗体で正常腎臓を染色しているが、本願の請求の範囲記載の抗 NC1 モノクローナル抗体は、正常腎臓を染色せず、腎炎の腎臓のみを染色する方法及び抗 NC1 抗体に関する発明であります。

また、引用された文献（文献 1 と文献 2）での抗 NC1 モノクローナル抗体は、由来抗原、抗体の由来種、抗体の作成方法等が本願請求の範囲記載の抗 NC1 モノクローナル抗体と全く異なるものであります。

しかも、引用された文献（文献 3 と文献 4）は、本願請求の範囲記載の抗 NC1 モノクローナル抗体としての応用の記載がまったくなく、示唆する記載もありません。

以上

図1

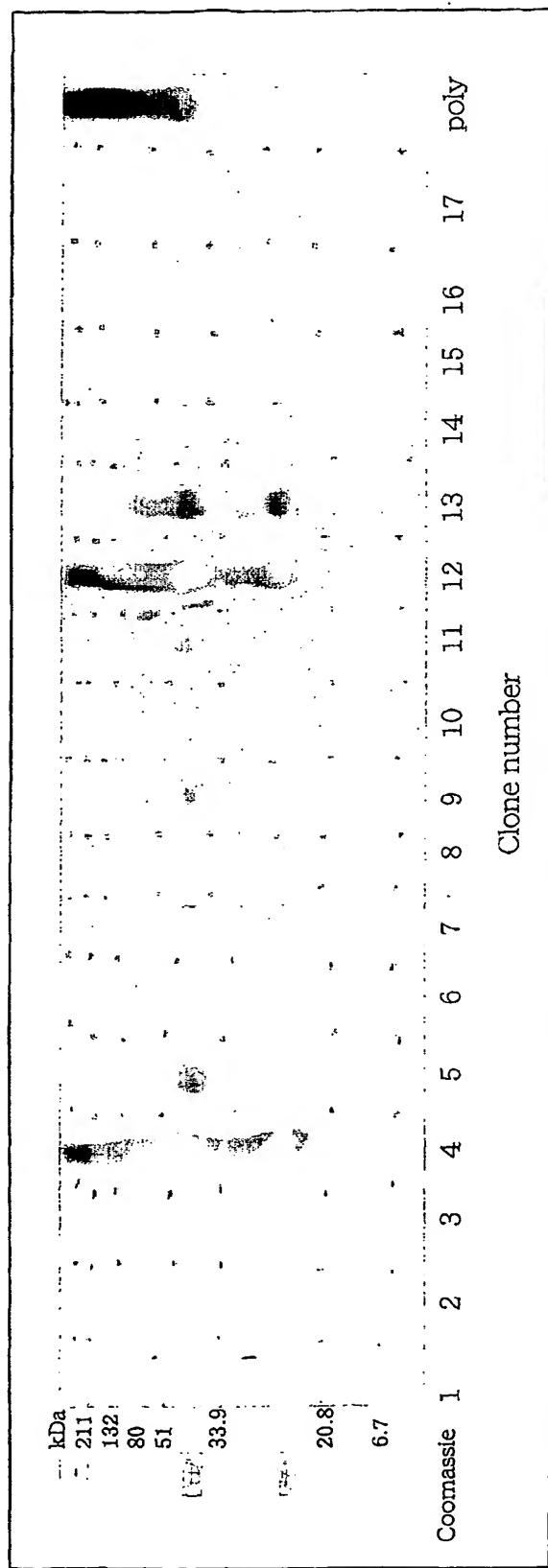
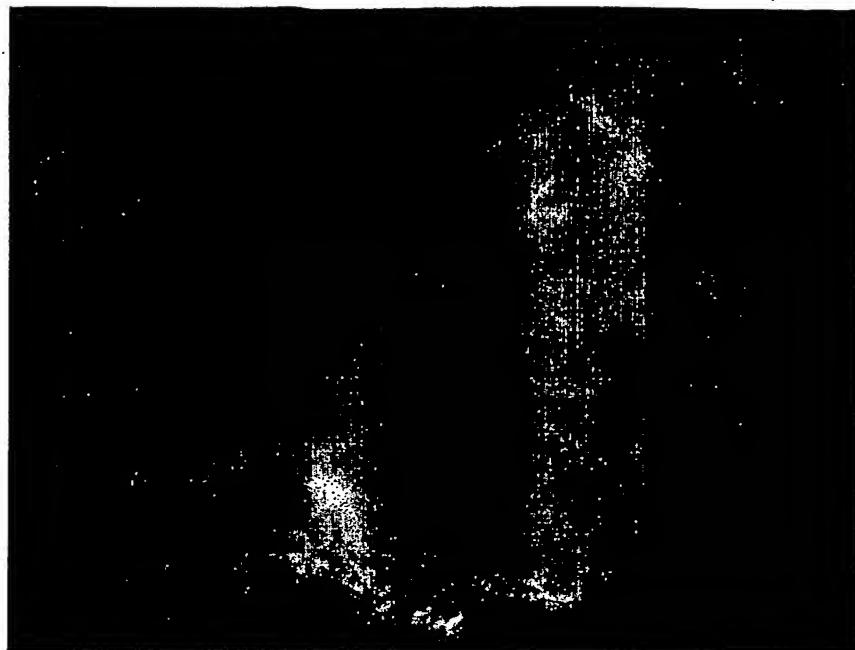
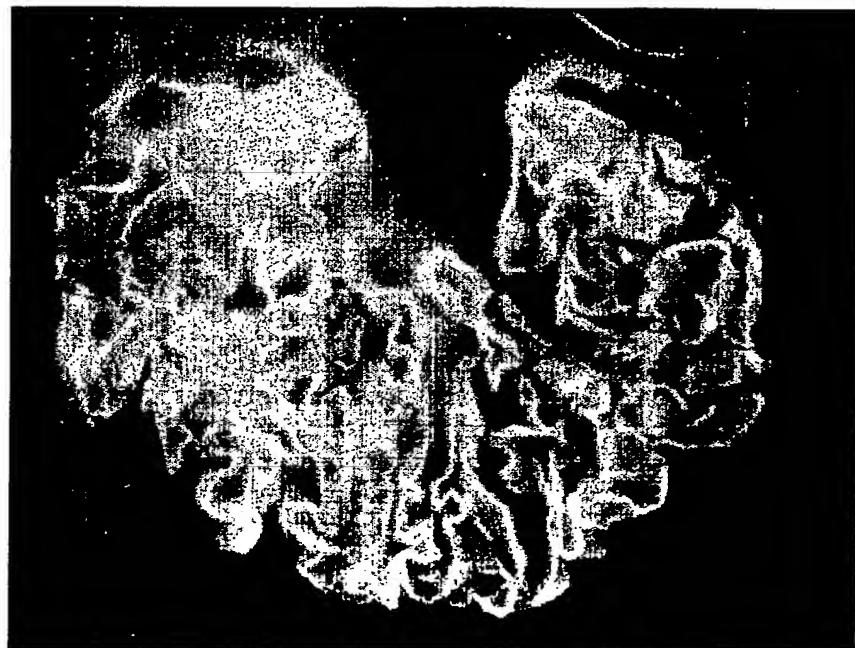


図 2



Control



Anti-GBM nephritis (No.2301)

図 3-1



Control

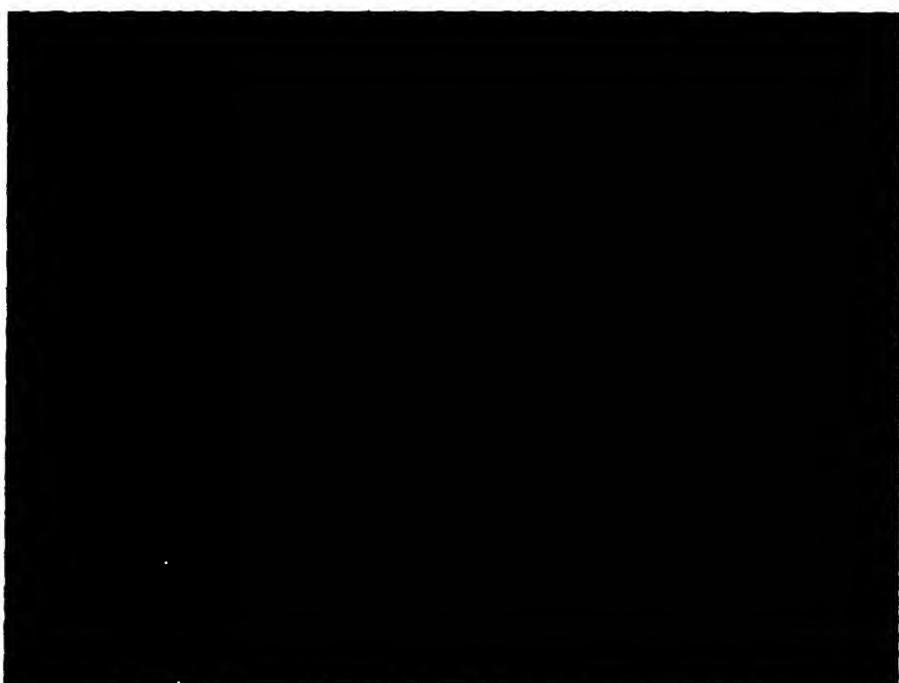


Anti-GBM nephritis (No.2301)

図 3-2



Control



Anti-GBM nephritis (No.2301)

差替え用紙 (規則26)

図4

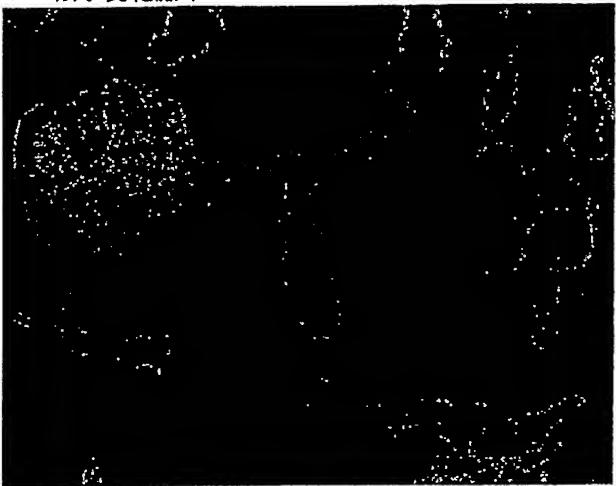
1 IgA腎症



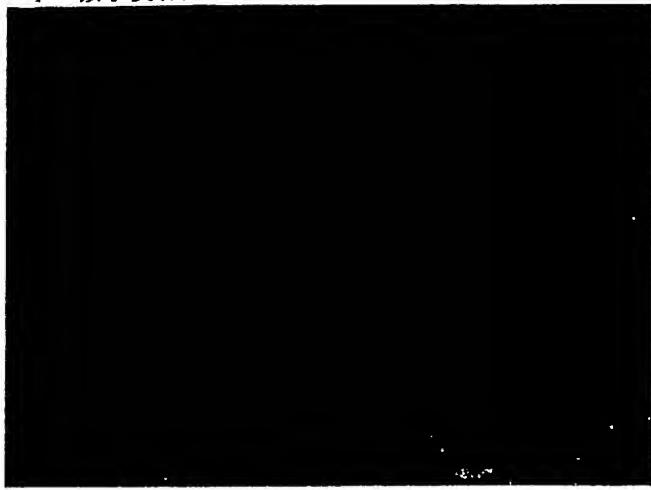
2 糖尿病腎症



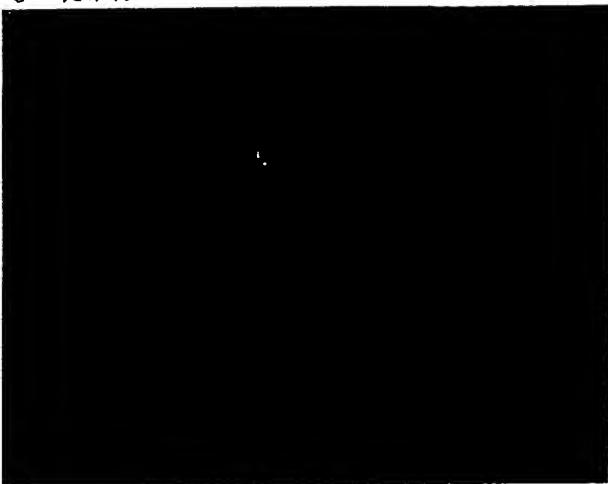
3 微小変化型ネフローゼ

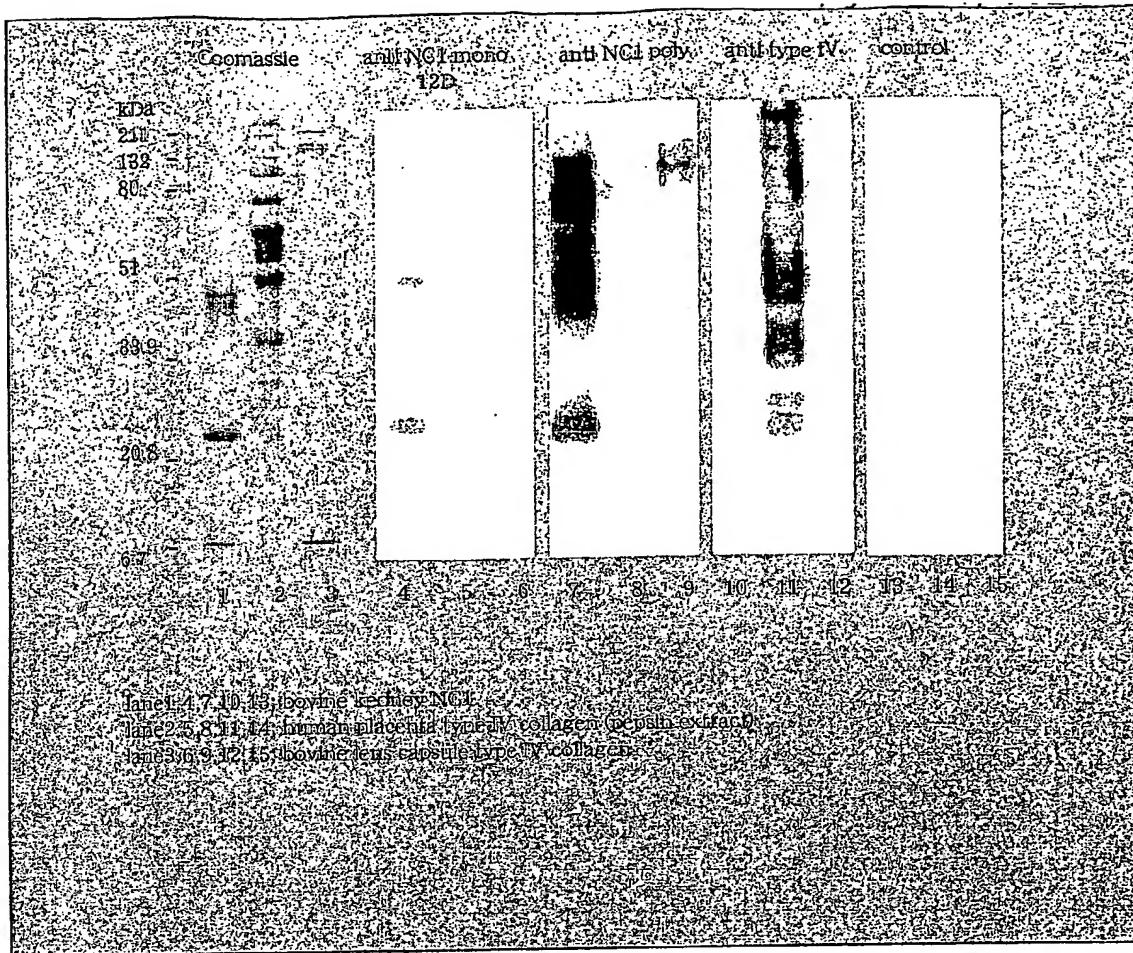


4 微小変化型ネフローゼ（治療後）



5 健常腎





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002669

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>7</sup> C07K16/18, G01N33/53, 33/577, C12P21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>7</sup> C07K16/18, G01N33/53, 33/577, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS), PubMed

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NINOMIYA, Y. et al., Differential expression of two basement membrane collagen genes, COL4A6 and COL4A5, demonstrated by immunofluorescence staining using peptide-specific monoclonal antibodies., The Journal of Cell Biology., September 1995, Vol.130, No.5, pages 1219 to 1229	1, 2, 4
Y		3
X	SUGIHARA, K. et al., Experimental anti-GBM glomerulonephritis induced in rats by immunization with synthetic peptides based on six alpha chains of human type IV collagen., JOURNAL OF PATHOLOGY. March 1996, Vol.178, No.3, pages 352 to 358	1, 2, 4
Y		3

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
25 May, 2005 (25.05.05)Date of mailing of the international search report  
14 June, 2005 (14.06.05)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002669

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Kazutoshi YOKOYAMA et al., "Type IV Collagen no NC1 Ryoiki (K35) ni yori Yudo sareru Jin'en Model", The Cell, 20 April, 2002 (20.04.02), Vol.34, No.4, pages 36 to 39	1-4
Y	Kazutoshi YOKOYAMA et al., "Nyo to Kessei ni Okeru NC1 (Type IV collagen NC1 Ryoiki) to Ko NC1 Kotai no Sokutei", The Cell, 20 April, 2003 (20.04.03), Vol.35, No.4, pages 40 to 44	1-4

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002669

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 8

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 8 relates to an administration method in constructing an antibody or booster and thus pertains to methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy as well as diagnostic methods to be practiced on the human or animal body. Thus, it relates to (continued to extra sheet)

2.  Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3.  Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Requirement of unity of invention in the international application is not fulfilled unless there is a technical relationship between the groups of inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features (PCT Rule 13.1). The "special technical features" shall mean those technical features that define a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art (PCT Rule 13.2). (Continued to extra sheet)

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Claims 1 to 4.

## Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002669

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 14(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Concerning claims, the statement in the description points out that the invention as set forth in claim 6 seems an invention with the use of an anti-NC1 antibody. Thus, the matter common to the inventions as set forth in claims 1 to 6, 9 and 10 resides in "an anti-NC1 antibody". Thus, the matter common to the inventions as set forth in claims 1 to 6, 9 and 10 and the invention as set forth in claim 7 resides in "an antibody against type IV collagen". However, antibodies against type IV collagen had been publicly known prior to the filing of the present international application (see, for example, document 1: NINOMIYA, Y., et al., Differential expression of two basement membrane collagen genes, COL4A6 and COL4A5, demonstrated by immunofluorescence staining using peptide-specific monoclonal antibodies, The Journal of Cell Biology, September 1995, Vol.130, No.5, pages 1219-1229). Thus, "an antibody against type IV collagen" cannot be considered as "a special technical feature".

The matter common to the inventions as set forth in claims 1 to 4 resides in "an anti-NC1 monoclonal antibody immunologically reacting with NC1 in glomerulus" which can be considered as "a special technical feature". Since the matter common to the inventions as set forth in claims 5, 6, 9 and 10 resides in "an anti-NC1 antibody", the matter common to the inventions as set forth in claims 1 to 4 and the inventions as set forth in 5, 6, 9 and 10 resides in "an anti-NC1 antibody" too. However, anti-NC1 antibodies had been publicly known prior to the filing of the present international application too (see, for example, document 1). Thus, it can be concluded that there is no "special technical feature" common to the inventions as set forth in claims 1 to 4 and the inventions as set forth in claims 5, 6, 9 and 10.

Such being the case, claims have the following six invention groups:

- (1) the inventions as set forth in claims 1 to 4;
- (2) the invention as set forth in claim 5;
- (3) the invention as set forth in claim 6;
- (4) the invention as set forth in claim 7;
- (5) the invention as set forth in claim 9; and
- (6) the invention as set forth in claim 10.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C07K16/18, G01N33/53, 33/577, C12P21/08

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C07K16/18, G01N33/53, 33/577, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)、WPI(DIALOG)、JSTPlus(JOIS)、PubMed

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X		1, 2, 4
Y	NINOMIYA, Y., et al., Differential expression of two basement membrane collagen genes, COL4A6 and COL4A5, demonstrated by immunofluorescence staining using peptide-specific monoclonal antibodies., The Journal of Cell Biology. September 1995, Vol. 130, No. 5, pages 1219-1229.	3

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 25. 05. 2005	国際調査報告の発送日 14. 6. 2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 上條 雄 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3535

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	SUGIHARA, K., et al., Experimental anti-GBM glomerulonephritis induced in rats by immunization with synthetic peptides based on six alpha chains of human type IV collagen., JOURNAL OF PATHOLOGY. March 1996, Vol. 178, No. 3, pages 352-358.	1, 2, 4
Y	横山司甫, 他 3名, タイプIVコラーゲンのNC1領域 (K35) により誘導される腎炎モデル, 細胞, 2002. 04. 20, 第34巻, 第4号, p. 36-39	3
Y	横山司甫, 他 1名, 尿と血清に於けるNC1 (タイプIVコラーゲン NC1領域) と抗NC1抗体の測定, 細胞, 2003. 04. 20, 第35巻, 第4号, p. 40-44	1-4

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 8 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲8は、抗体作製時や追加免疫時の投与方法であり、手術又は治療による人体又は動物の体の処置方法及び人体又は動物の体の診断方法に該当し、PCT第14条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

国際出願における発明の単一性の要件（PCT規則13.1）は、請求の範囲に記載された一群の発明の間に一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的関係があるときに限り、満たされるものであって、この「特別な技術的特徴」とは、請求の範囲に記載された各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴のことである（PCT規則13.2）。

（特別ページに続く）

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 請求の範囲1-4

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## 第III欄の続き

そこで、請求の範囲をみると、請求の範囲6に記載された発明は、明細書中の記載を参考して、抗NC1抗体を利用した発明と認められるので、請求の範囲1-6、9、10に記載された発明に共通する事項は「抗NC1抗体」である。そうすると、請求の範囲1-6、9、10に記載された発明と請求の範囲7に記載された発明とに共通する事項は「タイプIVコラーゲンに対する抗体」である。しかしながら、タイプIVコラーゲンに対する抗体は、本国際出願時には公知（例えば、文献1：NINOMIYA, Y., et al., Differential expression of two basement membrane collagen genes, COL4A6 and COL4A5, demonstrated by immunofluorescence staining using peptide-specific monoclonal antibodies., The Journal of Cell Biology. September 1995, Vol. 130, No. 5, pages 1219-1229.）であったから、「タイプIVコラーゲンに対する抗体」は、「特別な技術的特徴」であるとはいえない。

また、請求の範囲1-4に記載された発明に共通する事項は「腎糸球体中のNC1と免疫反応をする抗NC1モノクローナル抗体」であり、これは「特別な技術的特徴」であるといえる。そして、請求の範囲5、6、9、10に記載された発明に共通する事項は「抗NC1抗体」であるから、請求の範囲1-4に記載された発明と請求の範囲5、6、9、10に記載された発明とに共通する事項も「抗NC1抗体」である。しかし、抗NC1抗体についても、本願出願時には公知（例えば、文献1）であったから、請求の範囲1-4に記載された発明と、請求の範囲5、6、9、10に記載された発明との間には、「特別な技術的特徴」は存在しないといえる。

したがって、請求の範囲には、

- ① 請求の範囲1-4に記載された発明、
- ② 請求の範囲5に記載された発明、
- ③ 請求の範囲6に記載された発明、
- ④ 請求の範囲7に記載された発明、
- ⑤ 請求の範囲9に記載された発明、
- ⑥ 請求の範囲10に記載された発明、

の6発明が包含されている。

## 第IV欄 要約（第1ページの5の続き）

本発明は、抗NC1モノクローナル抗体を用いて、一次性、二次性を問わず腎炎の早期を検出しようとするものである。本発明は、免疫グロブリンが腎糸球体他に沈着の起きない早期の腎生検試料を免疫染色で、又尿や血清などの試料より抗原抗体反応でNC1を見出だす事で腎機能の診断に有用な情報を与えるものである。更に治療に活用するものである。